

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/EP05/012101

International filing date: 11 November 2005 (11.11.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: DE

Number: 10 2004 054 584.7

Filing date: 11 November 2004 (11.11.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 16 December 2005 (16.12.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung****Aktenzeichen:** 10 2004 054 584.7**Anmeldetag:** 11. November 2004**Anmelder/Inhaber:** Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der
Wissenschaften eV, 80539 München/DE**Bezeichnung:** Induzierte Remineralisation von humanem
Zahnschmelz**IPC:** A 61 K 6/033**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 15. November 2005
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Stark

WEICKMANN & WEICKMANN

Patentanwälte

European Patent Attorneys · European Trademark and Design Attorneys

DIPL.-ING. **H. WEICKMANN** (bis 2001)

DIPL.-ING. **F. A. WEICKMANN**

DIPL.-CHEM. **B. HUBER**

DR.-ING. **H. LISKA**

DIPL.-PHYS. DR. **J. PRECHTEL**

DIPL.-CHEM. DR. **B. BÖHM**

DIPL.-CHEM. DR. **W. WEISS**

DIPL.-PHYS. DR. **J. TIESMEYER**

DIPL.-PHYS. DR. **M. HERZOG**

DIPL.-PHYS. **B. RUTTENSPERGER**

DIPL.-PHYS. DR.-ING. **V. JORDAN**

DIPL.-CHEM. DR. **M. DEY**

DIPL.-FORSTW. DR. **J. LACHNIT**

LL.M. DR. **U. W. HERBERTH ***

* Rechtsanwalt

Unser Zeichen:
34398P DE/MDwrsh

Anmelder:
Max-Planck-Gesellschaft zur
Förderung der Wissenschaften e.V.
Hofgartenstraße 8

80539 München

Induzierte Remineralisation von humanem Zahnschmelz

Induzierte Remineralisation von humanem Zahnschmelz

Beschreibung

5

Die vorliegende Anmeldung betrifft die induzierte Remineralisation von humanem Zahnschmelz und insbesondere den Aufbau von Apatit auf Zahnmaterial.

10

Zähne sind Verbundstoffe aus Apatit und Proteinen. Es handelt sich bei ihnen um sehr harte Biomaterialien auf der Basis von Calcium und Phosphat. Der Zahnschmelz, die äußere Schicht der Zahnkrone ist der härteste Teil des Zahns und enthält keine lebenden Zellen. Zahnschmelz besteht aus anorganischen Kristallen, welche typische hoch orientierte Anordnungen aufweisen. Zahnschmelz ist ein Gewebe, das, sobald es einmal gebildet ist, lebenslang nahezu unverändert bleibt, da die Zellen, welche beim Aufbau der Zähne beteiligt sind, absterben, sobald die Zahnbildung abgeschlossen ist. Ein fertiger Zahnschmelz besteht aus etwa 95 Gew.-% Apatit, etwa 3 Gew.-% Proteinen und Lipiden und etwa 2 Gew.-% Wasser.

15

20

Um Schädigungen von Zähnen, insbesondere durch Karies zu vermeiden oder zu reparieren, wurde seit langem versucht, remineralisierende Systeme einzusetzen. Dabei wurde zunächst versucht, durch Aufbringen von Calciumphosphatverbindungen die Beschaffenheit der Zähne zu verbessern. Solche Einkomponentensysteme, bei denen versucht wird, bereits vorgefertigtes Zahnmaterial, beispielsweise Apatit, Hydroxyapatit oder andere Calciumphosphatverbindungen auf die Zähne aufzubringen, sind unter anderem in EP 0 666 730 B1 oder WO 01/95863 beschrieben. Das Problem solcher Systeme besteht darin, dass das Behandeln von Zahnmaterial mit Calciumphosphatverbindungen nicht zu einem Aufwachsen von strukturell dem Zahnmaterial ähnlichem Apatit führt,

25

30

sondern vielmehr zu einer bloßen Anlagerung von Apatitkristallen auf dem Zahnmaterial, wobei die Apatitkristalle eine vom Zahnmaterial völlig unterschiedliche Morphologie aufweisen. Somit wird keine Festigung des Zahnschmelzes oder dauerhafte Füllung von Läsionen bewirkt, da die angelagerten Apatitkristalle keine ausreichende Ähnlichkeit und Haftung zum natürlichen Zahnmaterial aufweisen.

Weiterhin wurde versucht mit Zweikomponentensystemen eine Remineralisierung von Zähnen zu erhalten, wobei die Systeme üblicherweise eine Calciumphase sowie eine Phosphatphase umfassen. Zweikomponentensysteme sind beispielsweise in WO 98/10736 und DE 33 03 937 A1 beschrieben. Nachteilig bei den dort beschriebenen Vorgehensweisen ist, dass die in WO98/10736 beschriebene Methode Calcium- und Phosphatlösungen vor der Anwendung vereinigt, sodass sich eine metastabile Lösung bildet, aus der auf dem Zahn Apatit auskristallisieren soll. Die Methode erlaubt keine lokalisierte Behandlung am Zahn, da das Reagenz als Mundspülung oder Gel eingesetzt wird, das mit der Zahnbürste einmassiert wird. Weiterhin wird die Kompositnatur des nativen Schmelzes nicht berücksichtigt, da im System keine organische Komponente enthalten ist. Die Bildung zahnschmelzähnlicher Kristallite ist demnach unwahrscheinlich. DE 33 03 937 beschreibt ein Verfahren, bei dem Calcium- und Phosphationen getrennt nacheinander auf den Zahn aufgebracht werden, indem dieser in eine Kappe getaucht wird, welche die entsprechenden Ionen in einer Gelatinematrix enthält. Bei einer empfohlenen Einwirkungszeit von nur zwei Minuten ist nicht zu erwarten, dass sich wirklich größere Mengen Apatit auf der Zahnoberfläche bilden können. Es ist nicht mit Bildmaterial belegt, dass die neugebildete Apatitschicht schmelzähnliche Strukturen aufweist.

In weiteren Arbeiten (S. Busch et al., Eur. J. Inorg. Chem. (1999), 1643-1653; S. Busch et al., Chem. Mater. 13 (2001), 3260-3271; S. Busch, Zahnärztliche Mitteilungen 91, Nr. 10 (2001), 34-38; R. Kniep et al.,

Angew. Chem. 108, Nr. 22 (1996), 2787-2791) wurde die biomimetische Morphogenese von Fluorapatit-Gelatinkompositen untersucht. Dabei wurde biomimetisches Wachstum und Selbstorganisation von Fluorapatit-Aggregaten durch Diffusion in denaturierten Collagen-Matrizes beobachtet.

5 Die Grundlagen der Fluorapatitbildung in Gelatine-Gelen wurde dabei mittels Doppeldiffusionsversuchen von Calcium- und Phosphatlösungen in einem U-Rohr untersucht. Diese Arbeiten beschreiben die Bildung von Fluorapatitkügelchen innerhalb des verwendeten Gels.

10 WO 03/099234 A1 beschreibt ein Verfahren zum Aufwachsen von Apatit auf Zahnmaterial, umfassend die Schritte:

- (i) Auftragen eines ersten Gels, welches Gelatine sowie Phosphationen umfasst,
- (ii) Auftragen eines zweiten Gels, wobei mit diesem zweiten Gel die erste Gelschicht abgedeckt wird und
- (iii) Auftragen eines Calciumionen enthaltenden Mediums,

15 wobei ein Aufbau von Apatit an der Oberfläche des Zahnmaterials bewirkt wird.

20 Mit diesem Verfahren konnten bereits gute Ergebnisse erhalten werden. Es war jedoch wünschenswert, dieses Verfahren, insbesondere im Hinblick auf die Wachstumsgeschwindigkeit der Apatitschicht weiter zu verbessern.

25 Eine Aufgabe der vorliegenden Anmeldung war es deshalb, ein Verfahren bereitzustellen, mit dem Defekte an Zahnmaterial durch Remineralisation mit hoher Wachstumsrate ausgebessert werden können.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch die Verwendung

- (i) eines alkalischen Mediums,
- (ii) eines ersten Gels, welches Gelatine sowie Phosphationen umfasst, und

(iiia) eines zweiten Gels, welches frei von Phosphationen ist, wobei mit diesem zweiten Gel die erste Gelschicht abgedeckt wird und/oder
(iiib) eines Calciumionen enthaltenden Mediums,
zur Herstellung eines Mittels bzw. eines Kits zum Aufwachsen von Apatit
auf Zahnmaterial.

Überraschenderweise wurde festgestellt, dass durch Vorbehandlung des Zahnmaterials mit einem alkalischen Medium eine deutliche Erhöhung der Wachstumsgeschwindigkeit von Fluorapatit auf Zahnproben, insbesondere

10 humanen Zahnproben, erzielt werden kann. Insbesondere konnten

Wachstumsraten von 3 bis 5 $\mu\text{m}/\text{Tag}$ erreicht werden.

Erfindungsgemäß bevorzugt wird als alkalisches Medium eine alkalische Lösung, insbesondere eine wässrige alkalische Lösung, oder ein alkalisches

15 Gel eingesetzt. Das alkalische Medium hat dabei bevorzugt einen pH-Wert

von 7,1 bis 14, insbesondere von mindestens 7,3, mehr bevorzugt von

mindestens 7,5 und am meisten bevorzugt von mindestens 8 und

bevorzugt bis zu 10, mehr bevorzugt bis zu 9. Besonders vorteilhaft wird

als alkalisches Medium eine Zusammensetzung eingesetzt, die im Mundraum von Menschen verträglich ist, beispielsweise eine 0,05 bis 1N

20 NaOH-Lösung. Es hat sich herausgestellt, dass das alkalische Medium, und

insbesondere Natronlauge, weiterhin vorteilhafterweise bereits

Calciumionen enthalten kann, beispielsweise 10 bis 50 % einer 0,1 bis

0,3N CaCl_2 -Lösung.

25 Erfindungsgemäß ist es möglich, ein wirkliches Aufwachsen von Zahnschmelz-ähnlichem Material zu erzielen. Ein wesentlicher Vorteil besteht darin, dass eine hohe Ordnung kleiner Apatitnadeln erhalten wird,

die strukturell eine große Ähnlichkeit zu nativem Zahnschmelz aufweisen.

30 Bei entsprechender Substratorientierung ist praktisch kein Unterschied

zwischen aufgewachsenem Apatit und ursprünglichem Zahnmaterial zu

erkennen.

Weitere Vorteile der Erfindung sind, dass von einem echten Aufwachsen der Fluorapatitkristallite auf dem Zahnsubstrat ausgegangen werden kann. Die Vickers-Härte dieser neuen Schicht entspricht dem natürlichen Schmelz. Die Durchführung der einzelnen Schritte ist so einfach, dass die 5 Remineralisation von Zahnschmelz im Prinzip vom Patienten selbst durchgeführt werden kann. Das Gel kann lokal auf die geschädigten Stellen aufgetragen werden und verfestigt sich dort. Da das erwärmte Gel sehr schnell abkühlt, sind kaum Wartezeiten zwischen den einzelnen Schritten nötig.

10

Da die Erweichungstemperatur des Gels etwas über der normalen Körpertemperatur liegt (38 bis 42 °C), wird ein Schmelzen des Gels während der Einwirkungsdauer verhindert. Damit kann eine unkontrollierte Mineralisation vermieden werden.

15

Erfindungsgemäß wird Apatit auf Zahnmaterial aufgewachsen, indem (i) ein alkalisches Medium aufgetragen wird, und (ii) ein erstes Gel, welches Gelatine sowie Phosphationen umfasst, auf das mit dem alkalischen Medium vorbehandelte Zahnmaterial aufgetragen wird.

20

Weiterhin wird erfindungsgemäß einer der Schritte (iiia) oder (iiib) oder beide Schritte durchgeführt, also das Auftragen eines zweiten Gels, welches frei von Phosphationen ist, wobei mit diesem zweiten Gel die erste 25 Gelschicht abgedeckt wird und/oder das Auftragen eines Calciumionen enthaltenden Mediums. Insbesondere bei Verwendung eines Calciumionen enthaltenden Gels als Calciumionen enthaltenden Medium kann dieses Gel direkt (also ohne Behandlung mit dem Gel (iiia)) auf das erste Gel aufgebracht werden.

30

Erfindungsgemäß wurde weiterhin festgestellt, dass durch Verwendung eines ersten Gels, welches weiterhin mindestens eine

Calciumphosphatverbindung enthält, ebenfalls eine Verbesserung der Wachstumsgeschwindigkeit von Fluorapatit erzielt werden kann. Geeignete Calciumphosphatverbindungen sind beispielsweise Fluorapatit, Monetit, Brushit, amorphes Calciumphosphat, Hydroxylapatit etc. Die 5 Calciumphosphatverbindung wird bevorzugt in Form von Partikeln und am meisten bevorzugt in Form von sphärischen oder überwiegend sphärischen Partikeln eingesetzt. Die Größe der Partikel beträgt dabei vorzugsweise 5 bis 50 μm , insbesondere 10 bis 20 μm . Geeigneterweise wird dem ersten 10 Gel 5 bis 30 Gew.-% an Calciumphosphatverbindungen zugesetzt. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform umfasst das erste Gel 5 bis 30 Gew.-% überwiegend sphärischer Fluorapatitpartikel mit einer Größe von 5 bis 50 μm .

15 Durch Zugabe von Fluoridionen zum phosphathaltigen Gel kann die Resistenz der Schicht gegenüber Säuren erhöht werden.

Erfindungsgemäß ist es möglich durch induzierte Remineralisation Zahnschmelzdefekte zu regenerieren. Durch den Einsatz eines zweischichtigen Gels, welches bei Körpertemperatur fest ist und lokal auf 20 die betroffene Stelle am Zahn aufgebracht werden kann sowie durch die Verwendung einer Mundspülung als Calciumionen enthaltenden Medium werden Mineralisationsbedingungen geschaffen, welche die Bildung einer Zahnschmelz-ähnlichen Substanz bewirken, die direkt auf dem Zahn 25 aufwächst. Bei der bisher veröffentlichten Doppeldiffusionsmethode wurde lediglich gezeigt, dass Fluorapatit, der durch Gegenstromdiffusion von Calcium- und Phosphationen in einem Gelatinegel entsteht, kugelige Aggregate bildet, deren organischer Gewichtsanteil dem von reifem, menschlichem Zahnschmelz entspricht. Die Doppeldiffusionsmethode hat aber weder eine Möglichkeit eröffnet, am Menschen die Remineralisation 30 von Zahnschmelz zu ermöglichen noch diese Möglichkeit in irgendeiner Weise impliziert. Der bei der Doppeldiffusionsmethode eingesetzte Versuchsaufbau bewirkt die Bildung von kleinen Kugelchen und erlaubt

nicht das Aufwachsen von gleichmäßigen Schichten von Apatitmaterial auf einem Substrat. Dies ist erst durch die erfindungsgemäße Vorgehensweise möglich.

5 Die Erfindung lässt sich insbesondere beim Menschen anwenden. Dabei können beispielsweise kleinere kariöse Defekte durch induzierte Remineralisation ausgeheilt oder empfindliche Stellen am Zahn mit einer schützenden Apatitschicht bedeckt werden. Die Vorgehensweise zur Behandlung ist dabei bevorzugt wie folgt: Die kariöse Stelle wird zunächst 10 mit einem alkalischen Medium, z.B. mit Natronlauge, behandelt und dann mit einer dünnen Schicht des etwa 50 °C warmen phosphathaltigen Gels bestrichen oder mit einer geeigneten Spritze aufgetragen, die gewärmt werden kann. Das Gel erstarrt sofort auf der Zahnoberfläche und wird nach 15 der gleichen Methode mit dem Schutzgel bzw. einem Calciumionen enthaltenden Mittel abgedeckt. 1 bis 3 mal am Tag wird dann gegebenenfalls mit einer Calciumlösung eine etwa 10-minütige Mundspülung durchgeführt. Anstelle der Mundspülung kann auch ein Auftragen eines Calciumionen enthaltenden Gels vorgenommen werden. Bevorzugt ist z.B. ein 0,1 bis 0,5 N Calcium-Gel, durch welches die 20 Applikation weiter vereinfacht wird. Zwischen den Spülungen wird der Zahn mit einer passenden Kappe abgedeckt, die aus Plastik oder Metall sein kann, sodass der Patient nicht behindert ist und die Remineralisation ungestört stattfinden kann. Wenn viele Zähne betroffen sind, kann auch die 25 ganze Zahnrreihe mit einer Schiene geschützt werden, wie sie z.B. gegen Zähneknirschen eingesetzt wird. Alle zwei Tage wird das Gel gewechselt, zu dieser Gelegenheit wird der betroffene Zahn gereinigt und desinfiziert.

Erfindungsgemäß wird auf das Zahnmaterial ein erstes Gel aufgebracht. Dieses Gel enthält Gelatine sowie Phosphationen und gegebenenfalls 30 weitere Bestandteile, insbesondere Calciumphosphate, wie oben erläutert. Der Gehalt an Gelatine im ersten Gel beträgt bevorzugt von mindestens 15 Gew.-%, mehr bevorzugt von 25 Gew.-% bis zu 40 Gew.-%, mehr

bevorzugt bis zu 30 Gew.-%. Der Gelatine kommt insbesondere eine Funktion bei der Ausbildung der Morphologie des gebildeten Apatits zu. Es wurde überraschenderweise festgestellt, dass bei der Verwendung von Gelatine ein Apatitmaterial an der Oberfläche von Zahnmaterial abgeschieden wird, welches eine große Ähnlichkeit mit nativem Zahnschmelz aufweist. Bei Verwendung anderer organischer Matrices wurden hingegen andere Morphologien der Apatitkristallivate beobachtet, sodass es nicht zu einem Aufbau von Apatit an der Oberfläche des Zahnmaterials, wie erfindungsgemäß angestrebt, kommt.

10

Gelatine ist ein Polypeptid, welches insbesondere durch Hydrolyse des in Haut und Knochen von Tieren enthaltenen Collagens gewonnen werden kann. Gelatine weist üblicherweise ein Molekulargewicht von 15.000 bis über 250.000 g/mol auf und kann aus Collagen unter sauren oder alkalischen Bedingungen gewonnen werden. Erfindungsgemäß bevorzugt werden folgende Gelatinen eingesetzt: Sauer hydrolysierte Gelatinesorten (Typ A), z.B. hergestellt aus Schweineschwarze oder Kalbshaut mit hohem Bloom-Wert, z.B. 250 bis 350 Bloom (unter dem Bloomwert versteht man eine Kenngröße, welche die Gelfestigkeit kennzeichnet, im Allgemeinen gilt, je höher der Bloomwert, umso höher der Anteil langkettiger Moleküle in der Gelatine und um so höher die Gelfestigkeit).

15

20

Neben Gelatine, welche zur Ausbildung der gewünschten Morphologie des Apatits und den Aufbau an der Oberfläche des Zahnmaterials enthalten ist, umfasst das erste Gel weiterhin Phosphationen. Diese Phosphationen stellen einen Grundbestandteil des aus Calciumphosphat aufgebauten Apatits dar. Die Konzentration der Phosphationen im ersten Gel beträgt bevorzugt mindestens 0,01 mol/l, mehr bevorzugt mindestens 0,05 mol/l und bis zu 0,5 mol/l, mehr bevorzugt bis zu 0,2 mol/l und insbesondere 0,08 mol/l.

25

30

Das erste Gel weist bevorzugt eine Erweichungstemperatur auf, die über der normalen Körpertemperatur liegt, sodass das Gel bei Körpertemperatur fest ist. Die Erweichungstemperatur des ersten Gels liegt bevorzugt im Bereich von 38 bis 45 °C, mehr bevorzugt von 38 bis 42 °C. Das erste Gel wird bevorzugt in erwärmer Form, beispielsweise auf 45 bis 55 °C erwärmt aufgetragen. Nach dem Auftragen kühlt das Gel ab und wird fest.

Erfindungsgemäß kann in einem weiteren Schritt ein zweites Gel, ein sogenanntes Schutzgel aufgetragen werden. Mit diesem zweiten Gel wird insbesondere die erste Gelschicht abgedeckt. Das Schutzgel, welches als Geldeckschicht fungiert, bewirkt überraschenderweise, dass die Mineralisation, also die Bildung von Apatit, überwiegend oder ausschließlich an der Zahnoberfläche und nicht an der Grenzschicht Gel-Flüssigkeit stattfindet. Durch den zweischichtigen Gelaufbau, der beim erfindungsgemäßen Verfahren erzielt wird, kommt es zu einem Aufbau bzw. Aufwachsen von Apatit auf dem Zahnmaterial und nicht zu einer Kristallisation oder Ausbildung von Apatitkugeln innerhalb des Gels, wie es im Stand der Technik beschrieben wird. Durch den zweischichtigen Aufbau ist somit eine praktikable und technisch sinnvolle Remineralisation der Zähne möglich.

Der pH-Wert und die Gelkonzentrationen des zweiten Gels entsprechen typischerweise denen, die hierin für das erste Gel angegeben sind. Auch das zweite Gel weist bevorzugt eine Erweichungstemperatur von 38 bis 45 °C, insbesondere von 38 bis 42 °C auf und wird bevorzugt auf 45 bis 55 °C erwärmt aufgebracht.

In einem dritten Schritt oder anstelle des Schutzgels (insbesondere bei Verwendung eines Calciumionen enthaltenden Gels) wird schließlich ein Calciumionen enthaltendes Medium aufgebracht. Das Calciumionen enthaltende Medium stellt den weiteren zur Bildung von Apatit benötigten Grundbaustoff, nämlich Calciumionen bereit. Diese Calciumionen

diffundieren durch das Schutzgel und die erste Gelschicht bis zur Oberfläche des Zahnmaterials und werden dort als Apatit abgeschieden. Die Konzentration der Calciumionen im Calciumionen enthaltenden Medium beträgt vorzugsweise mindestens 0,01 mol/l, mehr bevorzugt mindestens 5 0,05 mol/l und bis zu 0,5 mol/l, mehr bevorzugt bis zu 0,2 mol/l und insbesondere 0,13 mol/l.

Es wurde festgestellt, dass erfindungsgemäß eine gleichmäßige Schicht paralleler oder strahlig gewachsener Apatitkristallite gebildet werden kann. 10 Weiterhin zeigt diese Schicht keinen oder nur einen Submikrometer großen Randspalt zum nativen Zahnmaterial auf. Die Wachstumsrichtung der Apatitkristallite erfolgt unabhängig von der Orientierung der Schmelzprismen senkrecht zum Substrat, sodass bei entsprechender Orientierung der Schmelzprismen die Längsorientierung der künstlich 15 aufgewachsenen Kristalle weitgehend identisch mit den Kristallen in den Prismen verläuft. Die Größenordnung von Schmelzkristallen und aufgewachsenem Fluorapatit ist gleich. Innerhalb der Schichten kann eine dichte und gleichmäßige Packung beobachtet werden. Weiterhin weist die aufgebrachte Apatitschicht eine Vickers-Härte auf, die der vom nativen Zahnschmelz entspricht. Die erfindungsgemäß aufgebrachten 20 Apatitschichten weisen insbesondere eine Vickers-Härte im Bereich von 250 bis 400 HV auf.

Erfindungsgemäß ist es möglich, Apatitschichten in beliebiger Dicke 25 aufzubringen, da die erreichte Schichtdicke von der Häufigkeit des Gelwechsels abhängig ist. Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren können Wachstumsgeschwindigkeiten von 3 bis 5 $\mu\text{m}/\text{Tag}$ erreicht werden.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird als erstes Gel ein Gelatine- 30 Glycerin-Gel eingesetzt. Das Gewichtsverhältnis von Gelatine zu Glycerin beträgt dabei bevorzugt 1:5 bis 5:1, insbesondere 1:2 bis 2:1. Glycerin hat die Wirkung, dass der Erweichungspunkt des Gels über die normale

5 menschliche Körpertemperatur angehoben wird. Die erzielte Gelfestigkeit ist notwendig, um das Zweischichtsystem während der Mineralisation zu erhalten, sodass eine gezielte, kontrollierte Kristallabscheidung ermöglicht wird. In einem flüssigen Gel würde es zu einer spontanen Präzipitation feinkristallinen Materials kommen, welches nicht am Zahn anwächst.

10 Das erste Gel enthält bevorzugt weiterhin Fluoridionen. Das Fluorid kann beispielsweise als Natriumfluorid oder Ammoniumfluorid zugegeben werden. In dieser Ausführungsform kann Fluor-reicher Apatit oder Fluorapatit auf der Oberfläche des Zahnmaterials aufgewachsen werden. Fluorapatit ist insbesondere säureresistenter als der Carbonat-haltige Hydroxyapatit des natürlichen Zahnschmelzes, wobei die Morphologie der sich bildenden Schichten aus Fluorapatit dennoch eine große Ähnlichkeit mit nativem Zahnschmelz aufweist.

15 20 Die Wachstumsgeschwindigkeit des Apatits oder Fluorapatits wird unter anderem durch den pH-Wert des ersten Gels bestimmt. Bevorzugt weist das erste Gel einen pH-Wert von 2,0 bis 6,0, insbesondere von 4,0 bis 6,0, mehr bevorzugt von 5,0 bis 5,5 auf.

25 30 Weiterhin wird als zweites Gel ein Schutzgel oder ein Calciumionen enthaltendes Gel eingesetzt. Mit diesem Gel wird die Phosphationen-haltige erste Gelschicht abgedeckt. Durch Verwendung dieser Gelschicht findet überraschenderweise die Apatitbildung ausschließlich an der Oberfläche des Zahnmaterials statt und es kommt nicht zu einer spontanen Auskristallisierung von Apatitkristalliten oder Kompositaggregaten, wie sie bei den im Stand der Technik bekannten Vorgehensweisen beobachtet wird. Im Gegensatz zu den Untersuchungen mit Doppeldiffusionskammern kann somit gezielt eine Beschichtung von Zahnmaterialoberflächen erhalten werden. Während das zweite Gel vorzugsweise keine Materialien enthält, die in den Apatit eingebaut werden sollen, also insbesondere Phosphationen-, Calciumionen- und/oder Fluorionen-frei ist, ist es in

bestimmten Ausführungsformen möglich, ein Calciumionen enthaltendes Gel als zweites Gel aufzubringen. Auch damit wurden Wachstumsgeschwindigkeiten von mehreren μm pro Tag erzielt. Zur Bildung des zweiten Gels kann ebenfalls Gelatine eingesetzt werden, wobei ein Gelatine-Glycerin-Gel bevorzugt ist. Als zweites Gel kann aber auch ein anderes Gel, z.B. ausgewählt aus Polysacchariden, etwa Agarose oder Carragnan, sowie Carboxymethylcellulose verwendet werden.

Schließlich kann das mit ersten Gel und gegebenenfalls mit Schutzgel beschichtete Zahnmaterial mit einem Calcium enthaltenden Medium behandelt werden. Als Calcium enthaltendes Medium kann beispielsweise eine Calciumionen enthaltende Lösung oder/und ein Calciumionen enthaltendes Gel eingesetzt werden. Das Calciumionen enthaltende Medium wird dabei bevorzugt unter Verwendung eines wasserlöslichen Calciumionen enthaltenden Salzes, beispielsweise aus CaCl_2 hergestellt.

Das Calciumionen enthaltende Medium weist bevorzugt einen pH-Wert von 6 bis 8 auf.

Erfindungsgemäß werden somit die beiden Bestandteile von Apatit, nämlich Phosphationen und Calciumionen jeweils getrennt als eigene Komponente zugeführt, wobei die Calciumphosphatbildung auf der Zahnmaterialoberfläche stattfindet.

Um ein lokales Übersäuern an der Mineralisationsfront durch die Protonenabgabe bei der Apatitbildung zu verhindern, wird das Phosphatgel bevorzugt mit einem Puffersystem versetzt, bevorzugt einem Essigsäurepuffer oder α - α - α -Tris-(hydroxymethyl)methylamin-Puffer.

Vor der Behandlung mit dem alkalischen Medium oder/und mit dem ersten Gel kann das Zahnmaterial vorbehandelt werden, insbesondere entfettet, angeätzt oder/und gespült werden. Beispielsweise kann für eine bessere

Wirksamkeit die Zahnoberfläche zunächst mit Ethanol entfettet und mit Phosphorsäure angeätzt und anschließend mit entionisiertem Wasser gespült werden.

5 Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich insbesondere zur Behandlung von Humanzähnen oder Zahnschmelz. Dabei können kariöse Defekte durch Remineralisation behandelt werden oder aber auch das Zahnmateriale prophylaktisch mit einer schützenden Apatit- oder Fluorapatitschicht bedeckt werden. Die Apatitschichten bilden sich sowohl auf Zahnschmelz
10 als auch auf Dentin als Substrat.

Die Erfindung betrifft weiterhin eine Zusammensetzung bzw. einen Kit, welche bzw. welcher insbesondere für die oben beschriebene Verwendung geeignet ist und

15 a) ein alkalisches Medium
b) ein erstes Gel, welches Gelatine sowie Phosphationen umfasst, und
c1) ein zweites Gel, welches frei von Phosphationen ist oder/und
c2) ein Calciumionen enthaltendes Medium umfasst.

20 Die bevorzugten Ausgestaltungen der Bestandteile sind dabei wie oben beschrieben.

Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele weiter erläutert.

25 Beispiele

Beispiel 1 (Vergleichsbeispiel)

Schritt 1. Vorbereitung des Zahnmateriale

Ein humaner Zahn (beliebig) wurde von seiner Wurzel getrennt und die
30 Krone in etwa 0,5 mm breite Scheiben gesägt. Die Scheiben wurden 30 s lang in einer 30 %-igen Phosphorsäurelösung getaucht, mit entionisiertem Wasser gewaschen und getrocknet.

Schritt 2. Vorbereitung des Gels

Aus 8,56 g Gelatine, 8,24 g 85 %-iger Glycerinlösung, 7,26 g H_2O , 1,8 ml 2N NaOH, 2,7 ml 2 N HAc, 13,8 mg NaF, 236 mg Na_2HPO_4 wurde bei 80 °C unter Rühren ein homogenes Gel hergestellt, dessen pH-Wert bei 5,0 lag. Ein weiteres Gel wurde aus 8,56 g Gelatine, 8,24 g 85 %-iger Glycerinlösung und 11,76 g H_2O hergestellt. Eine 0,133 molare Calciumlösung wurde aus $CaCl_2$ -Salz hergestellt.

Schritt 3. Induzierte Mineralisation an der Zahnoberfläche

Die Oberfläche der Zahnscheiben wurde mit etwa 0,5 ml des phoshathaltigen Gels bestrichen. Nach dessen Verfestigung erfolgte eine Bedeckung mit etwa 0,5 ml des zusatzfreien Gels. Die Zahnscheibe wurde in ein einseitig verschlossenes Plastikrohr eingefügt und in einer Calciumlösung bei 37 °C gelagert. Das Gel und die Lösung wurden alle 7 Tage erneuert, insgesamt 16 x. Zur Begutachtung der aufgewachsenen Schicht erfolgte ein Aufbruch der Probe senkrecht zur Schnittfläche, um die Schichtdicke ausmessen zu können. Es bildete sich eine gleichmäßige Schicht elongierter Kristallite mit einer Schichtdicke von 7,2 μm . Das entspricht einer Wachstumsgeschwindigkeit von etwa 450 nm/Woche.

Beispiel 2

Die Vorgehensweise erfolgt analog Beispiel 1, jedoch wurde zunächst eine Behandlung mit einer alkalischen Lösung durchgeführt. Weiterhin erfolgte die Lagerung in Calciumlösung, wie oben beschrieben, oder in SBF (Simulated Body Fluid mit 142 mM Na^+ , 5 mM K^+ , 15 mM Mg^{2+} , 25 mM Ca^{2+} , 148,8 mM Cl^- , 4,2 mM HCO_3^{2-} , 1 mM HPO_4^{2-} , 0,5 mM SO_4^{2-}) oder trocken. Dabei konnten Wachstumsgeschwindigkeiten von 0,9 bis 1,4 $\mu m/Tag$ bei trockener Lagerung, von 1,4 bis 1,9 $\mu m/Tag$ bei Lagerung in SWF und von 2,1 $\mu m/Tag$ bei Lagerung in einer Ca-Lösung beobachtet werden. Die Schichtbildung erfolgte bevorzugt auf Dentin.

Beispiel 3

Das Vorgehen entspricht Beispiel 2. Es wurden jedoch Fluorapatit-Sphärolithen mit einem Durchmesser von $\leq 20 \mu\text{m}$, einem Durchmesser von 20 bis $25 \mu\text{m}$ bzw. einem Durchmesser von 50 bis $100 \mu\text{m}$ dem ersten Gel zugesetzt. Dabei konnten Wachstumsgeschwindigkeiten von $5 \mu\text{m/Tag}$ bei Zusatz von Fluorapatit-Sphärolithen mit einem Durchmesser $\leq 20 \mu\text{m}$, eine Wachstumsgeschwindigkeit von $4 \mu\text{m/Tag}$ bei Zusatz von Fluorapatit-Sphärolithen mit einem Durchmesser von 20 bis $25 \mu\text{m}$ und eine Wachstumsgeschwindigkeit von $1,25 \mu\text{m/Tag}$ bei Zusatz von Fluorapatit-Sphärolithen mit einem Durchmesser von 50 bis $100 \mu\text{m}$ erhalten werden.

Beispiel 4

Das Vorgehen entspricht Beispiel 2, wobei anstelle der Calciumlösung ein Calciumgel eingesetzt wurde. Auch hier konnten vergleichbare Wachstumsraten festgestellt werden.

Beispiel 5

Das Vorgehen entspricht Beispiel 4, wobei das Schutzgel weggelassen wurde. Auch hier wurden Wachstumsraten von $1,8$ bis $5 \mu\text{m/Tag}$ erhalten.

Ansprüche

1. Verwendung

5 (i) eines alkalischen Mediums,
(ii) eines ersten Gels, welches Gelatine sowie
Phosphationen umfasst, und
(iiia) eines zweiten Gels, welches frei von Phosphationen ist,
wobei mit diesem zweiten Gel die erste Gelschicht
10 abgedeckt wird und/oder
(iiib) eines Calciumionen enthaltenden Mediums,
zur Herstellung eines Mittels zum Aufwachsen von Apatit auf
Zahnmaterial.

15 2. Verwendung nach Anspruch 1,

d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
dass als alkalisches Medium eine alkalische Lösung oder ein
alkalisches Gel eingesetzt wird.

20 3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2,

d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
dass das alkalische Medium einen pH-Wert von 7,1 bis 14,
insbesondere von 7,5 bis 10 und bevorzugt von 8 bis 9 aufweist.

25 4. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,

d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
dass als alkalisches Medium 0,05 bis 1N NaOH eingesetzt wird.

30 5. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,

d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
dass das alkalische Medium weiterhin Calciumionen enthält.

6. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
dass als erstes Gel ein Gelatine-Glycerin-Gel eingesetzt wird.
- 5 7. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
dass das erste Gel weiterhin Fluoridionen enthält.
- 10 8. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
dass das erste Gel einen pH-Wert von 2,0 bis 6,0 aufweist.
- 15 9. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
dass das erste Gel weiterhin mindestens eine
Calciumphosphatverbindung enthält.
- 20 10. Verwendung nach Anspruch 9,
dadurch gekennzeichnet,
dass das erste Gel weiterhin eine Calciumphosphatverbindung
enthält, ausgewählt aus Fluorapatit, Monetit, Brushit, amorphes
Calciumphosphat und Hydroxylapatit.
- 25 11. Verwendung nach Anspruch 9 oder 10,
dadurch gekennzeichnet,
dass das erste Gel weiterhin Fluorapatitpartikel, insbesondere
sphärische Fluorapatitpartikel enthält.
- 30 12. Verwendung nach einem der Ansprüche 9 bis 11,
dadurch gekennzeichnet,
dass das erste Gel 5 bis 30 Gew.-% an
Calciumphosphatverbindungen, insbesondere an Fluorapatit enthält.

13. Verwendung nach einem der Ansprüche 9 bis 12,
dadurch gekennzeichnet,
dass das erste Gel sphärische Partikel von
Calciumphosphatverbindungen, insbesondere sphärische Partikel von
Fluorapatit enthält.

5

14. Verwendung nach einem der Ansprüche 9 bis 13,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Calciumphosphatverbindung als Partikel mit einer mittleren
10 Größe von 5 bis 50 μm , insbesondere von 10 bis 20 μm eingesetzt
werden.

15

15. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
dass das zweite Gel fluoridionenfrei ist.

16. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
dass das zweite Gel ausgewählt wird aus Gelatine-Glycerin-Gelen,
20 Polysaccharid-Gelen oder Carboxymethylcellulose-Gelen.

17. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
dass man als Calciumionen enthaltendes Medium eine Calciumionen
25 enthaltende Lösung oder ein Calciumionen enthaltendes Gel einsetzt.

18. Verwendung nach Anspruch 18,
dadurch gekennzeichnet,
dass man bei Verwendung eines Calciumionen enthaltenden Gels
30 kein zweites Gel (iiia) einsetzt.

19. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,

d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
dass das Calciumionen enthaltende Medium einen pH-Wert von 6 bis
8 aufweist.

5 20. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
dass man das Zahnmaterial vor dem Auftragen des alkalischen
Mediums oder/und vor dem Auftragen des ersten Gels entfettet,
anähtzt oder/und spült.

10 21. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
dass es sich bei dem Zahnmaterial um Humanzähne oder/und
Zahnschmelz handelt.

15 22. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
dass die Komponenten (i), (ii) und (iii) oder/und (iiib) zur Behandlung
von kariösen Defekten durch Remineralisation vorgesehen sind.

20 23. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
dass das Zahnmaterial mit einer schützenden Apatitschicht bedeckt
wird.

25 24. Zusammensetzung, insbesondere zur Verwendung nach einem der
Ansprüche 1 bis 12, umfassend
a) ein alkalisches Medium,
b) ein erstes Gel, welches Gelatine sowie Phosphationen
30 umfasst, und
c1) ein zweites Gel, welches frei von Phosphationen ist oder/und
c2) ein Calciumionen enthaltendes Medium.

25. Kit, insbesondere zur Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 12, umfassend

- a) ein alkalisches Medium,
- b) ein erstes Gel, welches Gelatine sowie Phosphationen umfasst,
- 5 c1) ein zweites Gel, welches frei von Phosphationen ist oder/und
- c2) ein Calciumionen enthaltendes Medium.

26. Zusammensetzung nach Anspruch 24 oder Kit nach Anspruch 25,

10 dadurch gekennzeichnet,
dass die Komponenten a), b) oder/und c1) bzw. c2) weiterhin wie in einem der Ansprüche 2 bis 19 definiert sind.

27. Verfahren zum Aufwachsen von Apatit auf Zahnmaterial, umfassend die Schritte

- (i) Auftragen eines alkalischen Mediums,
- (ii) Auftragen eines ersten Gels, welches Gelatine sowie Phosphationen umfasst, und
- (iiia) Auftragen eines zweiten Gels, wobei mit diesem zweiten Gel die erste Gelschicht abgedeckt wird und/oder
- (iiib) Auftragen eines Calciumionen enthaltenden Mediums,
wobei ein Aufbau von Apatit an der Oberfläche des Zahnmaterials bewirkt wird.

28. Verwendung

- (i) eines ersten Gels, welches Gelatine sowie Phosphationen umfasst, und
- (iia) eines zweiten Gels, welches frei von Phosphationen ist, wobei mit diesem zweiten Gel die erste Gelschicht abgedeckt wird und/oder
- (iib) eines Calciumionen enthaltenden Mediums,

zur Herstellung eines Mittels zum Aufwachsen von Apatit auf Zahnmaterial, wobei das erste Gel weiterhin mindestens eine Calciumphosphatverbindung enthält.

Zusammenfassung

Die vorliegende Anmeldung betrifft die induzierte Remineralisation von
5 humanem Zahnschmelz und insbesondere den Aufbau von Apatit auf
Zahnmaterial.

10 sh/ANM/34398PDE/11.11.2004